

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе Федерального государственного автономного образовательного учреждения «Северо-Кавказский федеральный университет»,
доктор технических наук, профессор

И. А. Евдокимов

«5» _____ 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного автономного образовательного учреждения «Северо-Кавказский федеральный университет» на диссертацию Хохлачевой Александры Алексеевны на тему «Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), количество страниц рукописи 167 с., г. Москва

Актуальность диссертационной работы

В последние десятилетия внимание биологов и биотехнологов все больше привлекают закономерности формирования и функционирования микробных сообществ. Этот вопрос имеет не только теоретическое, но и практическое значение, так как он является основой разработки способов управления такими сообществами, как в плане использования, так и борьбы с ними. К наиболее известным, давно использующимся, эволюционно сложившимся симбиозам микроорганизмов относятся кефирные грибки. Проведенные отечественными и зарубежными учеными исследования кефирных грибков были направлены на оптимизацию их культивирования при получении традиционного и пользующегося популярностью в нашей стране напитка - кефира, а также на исследование его функциональных свойств. Однако данные, касающиеся микробного состава кефирных грибков и взаимоотношений их компонентов, остаются отрывочными и противоречивыми. Глубокое исследование свойств микроорганизмов этого уникального симбиоза, разработка его модели позволяют расширить общие представления о возможной структуре ассоциаций микроорганизмов, являются необходимыми для создания новых экспериментальных сообществ и разработки способов управления стабильностью кефирных грибков, качеством и пробиотическими свойствами получаемых продуктов. Особый интерес в этом плане представляют экзополисахариды кефирного грибка,

которые обладают высокой биологической активностью и могут найти применение не только в пищевой, но и косметической промышленности, а также для получения биоразлагаемых пленок.

В связи с этим исследование, направленное на разработку концептуальной модели ассоциативной культуры микроорганизмов кефирных грибков и определение их биотехнологического потенциала, является актуальным.

Научная новизна работы

На основании впервые проведенных соискателем систематических исследований микробного профиля кефирных грибков, в том числе с использованием современных молекулярно-генетических методов, и их функциональной активности разработана концептуальная модель микробного сообщества кефирных грибков и определены в качестве продуцента этой системы молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus sp.* Проведены сравнительные исследования и показана идентичность состава основных видов молочнокислых бактерий кефирных зерен, используемых на разных молочных предприятиях.

В представленной на отзыв диссертационной работе определены новые закономерности формирования структуры сообществ микроорганизмов, обеспечивающие их стабильность и функциональную активность. Показана регулирующая роль индуцибельного фермента β -галактозидазы молочнокислых бактерий в обеспечении стабильности микробного сообщества при изменении углеводного питания. Выявлено присутствие двух физиологических групп молочнокислых бактерий кефирных грибков, отличающихся способностью к синтезу фермента β -галактозидаза: - синтезирующие β -галактозидазу и осуществляющие молочнокислое брожение при использовании лактозы; и вторая группа - не синтезирующие β -галактозидазу и осуществляющие молочнокислое брожение при использовании глюкозы. Впервые показано отсутствие различий в микробном профиле и функциональной активности кефирных зерен, культивируемых в течение длительного времени (более 4-х лет) на безлактозном молоке по сравнению с натуральным молоком, содержащем лактозу.

К новым результатам можно отнести данные о способности разных видов молочнокислых бактерий синтезировать водорастворимые экзополисахариды, по своей структуре аналогичные ЭПС кефирану, но различающиеся по молекулярной массе.

Практическая значимость работы.

Разработанная автором модель микробного сообщества кефирных грибков стала основой для разработки алгоритма направленного создания ассоциативной культуры кефирных грибков и управления их функционированием, что может быть использовано в молочной промышленности.

Результаты исследования позволяют получить биологически активный пробиотический продукт для людей с лактазной недостаточностью на основе культивирования кефирных зерен без изменения их микробного профиля и функциональной активности на безлактозном молоке, содержащем продукты гидролиза лактозы.

Важным практическим результатом работы является способ получения экзополисахаридов при культивировании *Leuconostoc mesenteroides* как на молочной сыворотке с добавлением сахарозы, так и на синтетической среде MRS с сахарозой, который стал основой заявки на патент. Соискателем также обоснованы направления практического использования полученных полисахаридов.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Обоснованность и достоверность основных положений и выводов подтверждена результатами экспериментов, проведенных в 3-кратной повторности. Достоверность экспериментальных данных обеспечивается удачным сочетанием стандартных, общепринятых и современных молекулярно-генетических методов исследований, применяемых в микробиологии и биотехнологической промышленности, а также стандартных методов статистической обработки результатов экспериментов. Выводы по отдельным этапам и работе в целом соответствуют результатам экспериментов.

Рекомендации по дальнейшему использованию и внедрению результатов диссертации.

Результаты и выводы работы могут быть использованы для совершенствования процессов культивирования кефирных грибков и получения новых пробиотических продуктов, организации производства ценных экзополисахаридов и рекомендуются для внедрения на предприятиях молочной и биотехнологической промышленности.

Оценка структуры и содержания диссертации, ее завершенность в целом.

Представленная для отзыва диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, заключения, списка литературы и приложений. Библиографический список содержит 210 источников. Работа изложена на 167 страницах, включая 20 страниц приложений, включает 27 таблиц и 25 рисунков.

Соискателем проведен анализ состояния вопроса, результаты которого изложены в главе 1. В научном обзоре представлен анализ имеющихся данных о механизмах и общих закономерностях функционирования ассоциативных культур микроорганизмов; результаты исследований микробного состава сообщества кефирных грибков и выявленные основные трофические взаимоотношения между компонентами; данные о способности синтеза экзополисахарида кефирана молочнокислыми бактериями, его химической структуре и биологической активности.

Анализ литературы позволил соискателю сформулировать цель и задачи работы, обосновать выбор объектов и методов исследований, которые подробно описаны во второй главе. Основными объектами исследований являлись кефирные грибки, применяемые при производстве кефира на разных молочных предприятиях), а также культуры бактерий, выделенные в процессе работы из кефирных зерен.

Следует отметить, что микробный профиль кефирных зерен определяли как классическими микробиологическими методами на основании выделения чистых культур высевом растертых кефирных грибков на плотные питательные среды с последующей их идентификацией методом 16S рПНК с учетом культурально-морфологических свойств, так и с использованием метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) «без выделения чистых культур». Структуру синтезированных экзополисахаридов определяли при использовании ИК-спектрального анализа. Определение молекулярной массы и термодинамических параметров ЭПС производили методом динамического и статистического светорассеивания.

В третьей главе представлены результаты исследований и их обсуждение.

Первый этап был посвящен исследованию микробного профиля кефирных грибков, культивируемых на нативном молоке. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что наружная поверхность и приповерхностный внутренний слой зерна представлены тесно переплетенными нитями палочковидных бактерий, погруженных в полисахаридный матрикс.

В работе представлены новые данные о структурной организации кефирных зерен. Показано, что наряду с живыми клетками в кефирном зерне присутствуют инактивированные клетки.

Соискателем был использован методический подход, основанный на выделении из посевов кефирных грибков на плотной питательной среде изолятов, колонии которых морфологически имели даже незначительные различия, и определении их физиологических свойств и функциональной активности. Автор убедительно доказал, что при сравнительной оценке микробного профиля кефирных грибков, используемых на разных молочных производствах, не выявлено различий среди доминирующих форм молочнокислых бактерий, исследованных кефирных грибков и культуральных жидкостей (заквасок) при их культивировании на молоке.

Следующий этап работы был связан с определением функциональной активности и микробного профиля кефирных грибков, длительное время культивируемых на молоке, не содержащем лактозу. При этом автором диссертационной работы не выявлено различий в функциональной активности и микробном профиле объектов по сравнению с кефирными грибами, культивируемыми на нативном молоке. Проведенные эксперименты показали возможность использования кефирных грибков для получения продуктов с пробиотическими свойствами не только на лактозе, но и других субстратах.

Результаты проведенных исследований позволили соискателю охарактеризовать трофическую цепь и предложить функциональную модель микробного сообщества кефирных грибков. Установлено, что продуцентом системы микробного сообщества кефирных грибков являются молочнокислые бактерии, относящиеся к первой физиологической группе, обладающие β -галактозидазной активностью, активно использующие лактозу для молочнокислого брожения в микроаэрофильных условиях. Присутствие в системе нескольких видов функционально сходных молочнокислых бактерий, обладающих β -галактозидазной активностью, определяет доминирование вида, кинетические характеристики которого более всего соответствуют складывающимся условиям в сообществе. Продуцентом системы является *Lactococcus lactis*, обладающий наибольшей активностью использования лактозы в данных условиях. Используя лактозу для молочнокислого брожения, эти бактерии приводят к снижению pH среды ниже оптимального значения для их роста, что приводит к снижению активности их роста и повышению активности роста бактерий *p.Lactobacillus*, способных развиваться при более низких значениях pH. Бактерии второй физиологической группы, а также дрожжи в консорциуме

кефирных грибков выполняют регуляторную функцию, удаляя из среды глюкозу, тем самым устраняют ее ингибирующее действие на синтез β -галактозидазы. Роль дрожжей в микробном сообществе кефирных грибков заключается не только в использовании глюкозы, галактозы и молочной кислоты для спиртового брожения, но и в стимулировании роста бактериальных культур продуктами их метаболизма и автолиза. Образующийся спирт используется уксуснокислыми бактериями в аэробных условиях.

На следующем этапе работы были исследованы процессы синтеза кефирными грибками экзополисахаридов, которые обладают функциональными свойствами.

При проведении скрининга молочнокислых бактерий кефирных грибков при использовании метода посева на твердую среду с красителем рутениевым красным соискателем показано, что около 60% выделенных изолятов способны синтезировать экзополисахариды (ЭПС). При определении активности синтеза экзополисахаридов отобранными культурами при их культивировании на жидкой среде MRS с различными источниками углерода были определены оптимальные условия процессов при использовании микроорганизмов разных физиологических групп. Автор показал, что экзополисахариды, синтезируемые культурами *L.lactis* и *L.mesenteroides* на среде с лактозой и сахарозой, аналогичны по структуре экзополисахариду кефирану, синтезируемому кефирными грибками.

Завершающим этапом исследований стала разработка режимов периодического и непрерывного культивирования культуры *L.mesenteroides* на молочной сыворотке с сахарозой и модифицированной среде MRS с сахарозой в условиях глубинного культивирования при постоянном pH и температуре, обеспечивающие уровень накопления ЭПС в среде до 3.5 г/л. Штамм *L.mesenteroides* как промышленно ценный микроорганизм депонирован в ВКПМ ФГУП ГосНИИгенетика.

При использовании метода динамического и статического светорассеивания было показано различие молекулярных масс ЭПС, синтезированных чистой культурой *L.mesenteroides* и кефирными грибками, что определяет возможные направления их эффективного использования.

Диссертация изложена четко и логично, является целостной завершенной научно-квалификационной работой, в которой разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как определённый вклад в развитие биотехнологической промышленности.

В процессе изучения материалов диссертации возникли следующие вопросы и замечания по работе.

1. В обзоре литературы имеются некоторые неточности. Так, в таблице 1.1 «Микробный бактериальный состав кефирных грибков» приведено название *Cryptococcus humicolus*, в то время как это не бактерии, а дрожжи из отдела базидиомицетов. В таблице 1.2. «Характеристики дрожжевых компонентов кефирных зерен» отмечено, что *Candida tibetica* сахара не сбраживает, а далее указано, что эта культура ассимилирует глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу и т.д.

2. При каких условиях (концентрация углеводов, температура, продолжительность культивирования) проводились эксперименты по изучению способности изолятов, выделенных из кефирного грибка, использовать разные источники углерода? В таблице 3.7, где показаны результаты этого эксперимента, не приведен разброс данных по титруемой кислотности, а между тем он может быть достаточно большим, так как данные приведены не для отдельных микроорганизмов, а для целых групп.

3. На с. 85 приведены результаты исследования свойств выделенных 55 чистых культур дрожжей, которые показали, что при их инкубировании в молоке не наблюдалось снижения рН среды, повышения показателей титруемой кислотности, не образовывался сгусток. На наш взгляд, эти результаты не позволяют говорить о том, что дрожжи кефирных грибков не обладают β -галактозидазной активностью. Какие еще экспериментальные данные позволили соискателю сделать этот вывод?

4. Чем можно объяснить данные о времени образования сгустка молочнокислыми микроорганизмами от 5 до 8 суток (табл. 3. 8) и о титруемой кислотности на уровне 275 и 300 °Т, соответственно, для КГлас- и КГлас+ (С. 91)?

9. С помощью какого метода были идентифицированы чистые культуры *Lactococcus lactis* и *Leuconostoc mesenteroides* (с.109), использующиеся в дальнейшем для синтеза экзополисахаридов?

5. В ряде таблиц (1.2, 1.5, 3.9) и на рис. 3.16 используются сокращения, которые не являются общепринятыми и не приведены в списке сокращений.

6. В некоторых графах таблиц (табл. 3.11, 3.13 и др.) показаны пределы значений, в других - точные цифры без указания относительной ошибки измерения, что затрудняет анализ данных.

7. Можно ли использовать предложенную в работе концептуальную модель микробного сообщества кефирных грибков для синтеза

искусственного кефирного грибка и объяснения механизмов формирования биопленок?

Сделанные замечания не сказываются на общей положительной оценке работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

В автореферате представлены все основные положения диссертации. Автором четко представлены основные составляющие диссертационной работы: актуальность, степень разработанности, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, степень апробации и достоверность полученных результатов, выводы.

Приведенное в автореферате краткое описание организации работы, результатов исследования, соответствие выводов автора экспериментальным данным свидетельствует о достаточно высокой квалификации автора в исследуемой области.

Описанные в автореферате основные результаты работы и выводы показывают, что поставленные цели и задачи автором полностью выполнены.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.

Основные положения работы и результаты исследований представлены соискателем на международных и всероссийских конференциях: на VI, VII и VIII Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011, 2013, 2015); на VI и IX Международных конгрессах молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2010» и «МКХТ-2013» (Москва, 2010, 2013); на XVI научной конференции отдела полимеров и композиционных материалов Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва, 2015). По материалам исследований соискателем опубликовано 11 печатных работ, в т.ч. 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Диссертационная работа Хохлачевой А. А. соответствует специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), по характеру исследования и полученным результатам удовлетворяет критериям «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября

2013 года, а ее автор Хохлачева Александра Алексеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв подготовлен Рябцевой Светланой Андреевной, профессором кафедры прикладной биотехнологии института живых систем.

Отзыв обсужден на заседании кафедры прикладной биотехнологии «30» октября 2015 г., протокол № 4.

Присутствовало на заседании 17 чел. В обсуждении приняли участие: 8. Результаты голосования: «за» - 17 чел., «против» – нет, «воздержалось» - нет.

Заведующий кафедрой
прикладной биотехнологии,
доктор технических наук, доцент

Алексей Дмитриевич Лодыгин

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования (ФГАОУ ВПО) «Северо-Кавказский федеральный университет»

355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1
Телефоны 89288263918, 89280084685
e-mail: allodygin@vandex.ru



Сведения о ведущей организации

по диссертационной работе Хохлачевой Александры Алексеевны на тему «Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Кавказский федеральный университет»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ФГАОУ ВПО СКФУ
Место нахождения	г. Ставрополь
Почтовый адрес, индекс	355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1
телефон	8(652) 95-68-08
Адрес электронной почты	info@ncfu.ru
Веб-сайт	http://www.ncfu.ru/
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	
1. Рябцева, С.А. Влияние лактулозы на заквасочную микрофлору / С.А. Рябцева, М.А. Брацихина // Молочная промышленность. - 2010. - № 4. - С. 56.	
2. Рябцева, С.А. Сохранение жизнеспособности заквасочной микрофлоры / С.А. Рябцева, М.А. Брацихина, В.И.Ганина // Молочная промышленность. - 2010. - № 1. - С. 22-23.	
3. Храмцов, А.Г. Тенденции развития способов получения галактоолигосахаридов / А.Г.Храмцов, А.Б. Родная, А.Д. Лодыгин, С.А. Рябцева // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. - 2011. - Т. 320-321. - № 2-3. - С. 5-8.	
4. Храмцов, А.Г. Инновационные технологии пребиотических концентратов на основе вторичного молочного сырья / А.Г. Храмцов, А.Д. Лодыгин, И.А. Евдокимов, С.А. Рябцева // Техника и технология пищевых производств.- 2012. - Т. 3. - № 26.- С. 139-145.	
5. Брацихина, М.А. Влияние углеводов на протеолитическую активность штаммов <i>Lactococcus lactis</i> / М.А. Брацихина, С.А. Рябцева // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2012. - № 4. - С. 47-54.	
6. Храмцов, А.Г. Применение дрожжей-продуцентов бета-галактозидаз для получения галактоолигосахаридов из лактозосодержащего сырья / А.Г. Храмцов, С.А. Рябцева, А.А. Панфилова, А.Б. Родная, А.Д. Лодыгин // Хранение и переработка сельхозсырья. - 2012. - № 8. - С. 36-39.	
7. Рябцева, С.А. Кисломолочное мороженое с лактулозой / С.А. Рябцева, В.Р. Ахмедова, М.А. Брацихина // Молочная промышленность. – 2013. - № 1. - С. 76-77.	
8. Рябцева, С.А. Дрожжи в молочной отрасли: классификация, свойства, применение / С.А. Рябцева, С.Е. Виноградская, А.А. Панфилова // Молочная	

- промышленностью – 2013. - № 4. - С. 64-66.
9. Рябцева, С.А. Сыворожка молочная: получение производных компонентов / С.А. Рябцева, А.Г. Храмцов, И.А. Евдокимов, А.Д. Лодыгин, П.Г. Нестеренко // Молочная промышленность. – 2013. - № 6. - С. 34-36.
 10. Котова, А.А. Анализ препаратов галактоолигосахаридов / А.А. Котова, С.А. Рябцева // Вестник Северо-Кавказского Федерального Университета. – 2013. - №3 (36). - С.128-131.
 11. Нестеренко, П.Г. Комплексное использование компонентов молочной сыворотки / П.Г. Нестеренко, А.Г. Храмцов, И.А. Евдокимов, С.А. Рябцева, А.Д. Лодыгин // Молочная промышленность. - 2014. - № 1. - С. 66-67.
 12. Маругина, Е.В. Влияние галактоолигосахаридов на развитие мезофильной закваски / Е.В. Маругина, С.А. Рябцева // Вестник Северо-Кавказского федерального университета. - 2015. - № 1 (46). - С. 61-65.
 13. Рябцева, С.А. Микробиология вторичного молочного сырья / С.А. Рябцева, И.А. Евдокимов, О.В. Кузнецова, Г.С. Анисимов. - Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2014. – 174 с. ISBN 978-5-9296-0697-7.

Верно:

Проректор по научной работе
ФГАОУ ВПО СКФУ,

доктор техн. наук, профессор

Дата 17.09.2015



И. А. Евдокимов